FUJIFILM

ハンドブック

DNA全血キット

QuickGene DNA whole blood kit S
（DB-S）

Ver.4.1

Contents

ご注意 本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断および臨床用試薬として使用しないでください。

1. はじめに

FUJIFILMの製膜技術により開発された薄さ80μmの多孔質フィルターを採用しました。
このフィルターを用いることで、加圧法にて核酸を抽出するシステムを実現しました。

このキットの特徴は以下のとおりです。

- このキットをご使用いただくことにより、簡便･迅速に全血（200μl）からゲノムDNAを抽出することができます。
- 8サンプル同時に抽出操作を行うことができます。
  ライセートセット後の抽出時間は以下のとおりです。
  QuickGene-810/QuickGene-800（以下QG-810/QG-800）：約6分
  QuickGene-Mini80（以下QG-Mini80）：約6分
- タンパク質やカオトロピック塩を含まない、高純度のゲノムDNAが得られます。得られた高品質のゲノムDNAはPCR、制限酵素処理、サザンブロッティングなどのアプリケーションに適しています。
- 遠心分離や有害な有機溶剤が不要です。

QuickGeneを用いて抽出を行う際は、各装置の取扱説明書をよくお読みください。

2. キット内容物と保存条件

2-1 キット内容物

以下の内容物が入っていますので確認してください。
キットには96処理分のゲノムDNA抽出用試薬が含まれています。

□ Protease（凍結乾燥品）	EDB	1本
□ Lysis Buffer	LDB	30ml
□ Wash Buffer	WDB	160ml
□ Elution Buffer	CDB	100ml
□ Cartridges（カートリッジ）	CA	96個
□ Collection Tubes（コレクションチューブ）	CT	96個
□ Caps（キャップ）	CAP	96個
□ Waste Tubes（ウェイストチューブ）	WT	96個

2-2 保存条件

指定の温度（15 ～ 28℃）で保存してください。試薬は指定の温度で保存した場合、購入後1年間安定です。溶解したEDBを冷蔵（4℃）で保存した場合、2カ月間安定です。
溶解後のEDBを－20℃で保存することで、酵素の安定期間を長くすることが可能です。その場合は少量ずつ分注するなどして、凍結、融解の繰り返しは避けてください。

3. キット以外にご準備いただくもの

① 試薬
- 特級エタノール（>99%）（ライセート調製時およびWDBの調製に使用）
- ヌクレアーゼフリー水（EDBの溶解に使用）

② 器具・機材
- QuickGene
- 未使用の遠沈管*（大/小のセット）
- マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ
- 1.5mlマイクロチューブ
- チューブスタンド
- チューブミキサー（2,500rpm程度の攪拌ができるもの）
- 簡易卓上遠心機
- ヒートブロックまたはウォーターバス（56℃で使用可能なもの）

＊ 遠沈管は、QG-810/QG-800で、所定量の特級エタノールを添加したWDB、CDBを入れる容器として使用します。QG-Mini80をご使用の場合は不要です。

遠沈管の推奨品は、表1のとおりです。使用するカートリッジ数に応じて使い分けてください。

表1　遠沈管の種類（QG-810/QG-800ご使用の場合）

バッファスタンド（または遠沈管ホルダ）のサイズ	対応するカートリッジ数	遠沈管の種類	品　名
標準	～16	大きい遠沈管（WDB用）	50 ml コニカルチューブ（BDファルコンなど）
		小さい遠沈管（CDB用）	15 ml コニカルチューブ（BDファルコンなど）
大	～72	大きい遠沈管（WDB用）	175 ml コニカルチューブ（BDファルコンなど）
		小さい遠沈管（CDB用）	50 ml コニカルチューブ（BDファルコンなど）

4.　取扱上の安全注意事項

◆ Protease EDB

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。
● 目、皮膚および衣服についたときは、水で充分に洗ってください。

◆ LDB（Lysis Buffer）

薬品の特性　　：● 飲むと有害の可能性があります。
取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。
● 目、皮膚および衣服についたときは、水で充分に洗ってください。
● この薬品を扱う場合は、適切な保護手袋および保護めがねを着用してください。

◆ WDB（Wash Buffer）

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。
● 目、皮膚および衣服についたときは、水で充分に洗ってください。

◆ CDB（Elution Buffer）

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。
● 目、皮膚および衣服についたときは、水で充分に洗ってください。

◆ LDBは、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。

◆ LDBを含む溶液や廃液は、絶対に漂白剤と混合しないでください。

◆ 感染性のおそれのあるサンプルを使用する場合

感染性のおそれのあるサンプルを扱う場合は、適切な保護具を着用してください。

◆ 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合

感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので関連する法に従い、焼却、溶融、滅菌、消毒などの処理をしてください。なお、処分業者に委託する場合は、特別管理産業廃棄物処分業の許可を受けた業者へ、特別管理産業廃棄物管理票（マニフェスト）を添えて処理を委託してください。

◆ 参考情報

各試薬の性状および取扱いに関する詳細情報は、MSDS（製品安全データシート）を参照してください。MSDSは弊社ホームページ（http://lifescience.fujifilm.com/）からダウンロードできます。

5.　使用上の注意事項

◆ サンプルに関する注意事項

- 検体の容量が200μl以下の場合は、PBS（滅菌済み）等で希釈して200μlになるように調製してください。
- EDTA･2Na、EDTA･2Kまたはヘパリンで採血した全血を使用してください。
- 全血は、できる限り採血後3日以内のものを使用してください。長期間保存した後の血液を用いた場合、収量の低下やDNAの分解を生じることがあります。
- 白血球数が2×10^6個を超えた場合、ゲノムDNA収量が低下することがあります。この場合はPBS（滅菌済）等で希釈して2×10^6個以下になるように調製してください。
  また、白血球数が5×10^6個を超えた場合、カートリッジ（CA）が詰まる可能性があります。PBS（滅菌済）等で希釈して抽出を行うことをお勧めします。

◆ 試薬に関する注意事項

- EDBにヌクレアーゼフリー水を添加後は時々攪拌しながら室温に30分以上置き、粉末が完全に溶解していることを確認してから使用してください。溶解が不充分の場合、目的の収量が得られないことやカートリッジ（CA）が詰まることがあります。

◆ 操作に関する注意事項

- すべての操作は室温（15～30℃）で行ってください。低温または高温での使用の場合､キットの性能が発揮されないことがあります。
- チューブミキサーは2,500rpm以上の攪拌ができるものを使用してください。ボルテックスが弱いと溶解が不充分となり、目的の収量が得られないことやカートリッジ（CA）が詰まることがあります。
- 抽出の途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- 収量はサンプルの状態により変動します。標準的なゲノムDNA収量は全血200μlあたり4～8μgです。
- 下記ページを参照し、QuickGeneの準備をした上でライセート作製を開始することをお勧めします。
  QG-810/QG-800をご使用の場合：8-3（p.14）、付録1（p.26）、付録2（p.27）
  QG-Mini80をご使用の場合：8-4（p.17）
- 詳しくは、QuickGeneの取扱説明書を参照してください。

6.　品質管理

- キットロット間の性能差がないことを確認しています。
- ゲノムDNAの収量や品質は260nmの吸光度、260nm/280nmの吸光度比によって確認しています。また、PCR増幅能があることを保証しています。

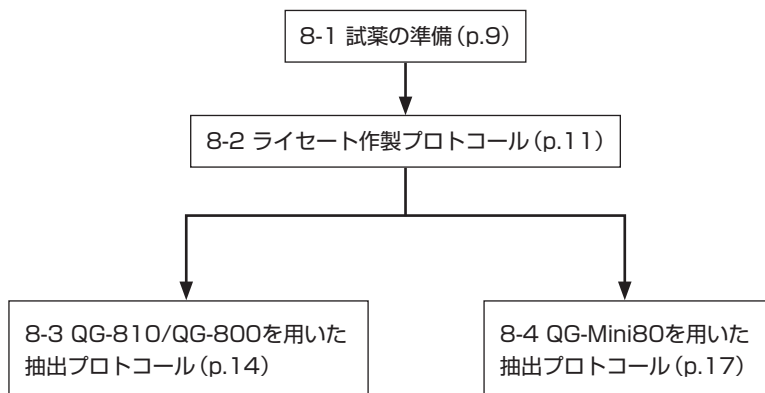
7.　製品説明

本キットを使用した場合、DNAとRNAが溶出液中に回収されます。全血（200 μl）から抽出したゲノムDNAの収量および純度（A260/280）を表2に示します。
収量はサンプルの状態により変動します。

表2

サンプル	ゲノムDNA収量（μg）	A260/280
全血（200 μl）	4～8	1.97

8. プロトコール

【Overview Flow Chart】

8-1 試薬の準備

◆EDB（凍結乾燥品）

凍結乾燥品を含む瓶に3.3mlのヌクレアーゼフリー水を添加し、完全に溶解させてください。溶解後のEDBは冷蔵（4℃）で保存する場合、2カ月間安定です。溶解後のEDBを−20℃で保存することで、酵素の安定期間を長くすることが可能です。その場合は少量ずつ分注するなどして、凍結、解凍の繰り返しは避けてください。

ご注意 EDBは以下の方法で完全に溶解させてから使用してください。
3.3mlのヌクレアーゼフリー水を添加後、蓋をして転倒混和します。
時々攪拌しながら室温に30分以上置き、粉末が完全に溶解していることを確認してから使用してください。溶解が不充分の場合、目的の収量が得られないことやカートリッジ（CA）が詰まることがあります。

◆LDB（30ml）

使用前に充分に混和してください。
析出物が生じた場合は、37℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

◆WDB（160ml）

濃縮状態でお届けします。
使用前に、ボトルに160mlの特級エタノール（>99%）を添加し、よく混和してください。エタノール添加後はボトル蓋ラベルの「ethanol added?」チェックボックスにチェックを入れてください。また、エタノール添加後は揮発を防ぐために、ボトルの蓋をしっかりと閉めてください。

◆CDB（100ml）

ゲノムDNA溶出時には、必ずCDBを使用してください。

◆WDB（特級エタノール添加済み）およびCDBの必要量（QG-810/QG-800をご使用の場合）

表3を参考に、抽出処理をするカートリッジ数に応じて、WDB、CDBの必要量を準備してください。

準備した液は指定の遠沈管（表1 p.5参照）に移し、QG-810/QG-800のバッファスタンド（または遠沈管ホルダ）の所定の位置にセットしてください。

表3　WDB、CDB必要量

カートリッジ数	WDB (QG-810/QG-800)	CDB (QG-810)	CDB (QG-800)
8	26ml	9ml	8ml
16	44ml	11ml	11ml
24	62ml	13ml	13ml
32	80ml	15ml	15ml
40	99ml	17ml	17ml
48	117ml	19ml	19ml
56	135ml	21ml	21ml
64	154ml	22ml	22ml
72	172ml	24ml	24ml

※ディスチャージなどに必要な液量は、
QG-810：WDB 8.0ml、CDB 7.4ml
QG-800：WDB 8.0ml、CDB 6.4mlです。
カートリッジ数に応じてWDB、CDBを加算してください。
1カートリッジあたり、WDB 2.25ml、CDB 200μl使用します。
例えばカートリッジを2本使用する場合は、12.5mlのWDBとQG-810では7.8mlのCDB、QG-800では6.8mlのCDBが必要です。

※WDB、CDB用遠沈管のサイズは表1（p.5）を参照してください。

8-2　ライセート作製プロトコール

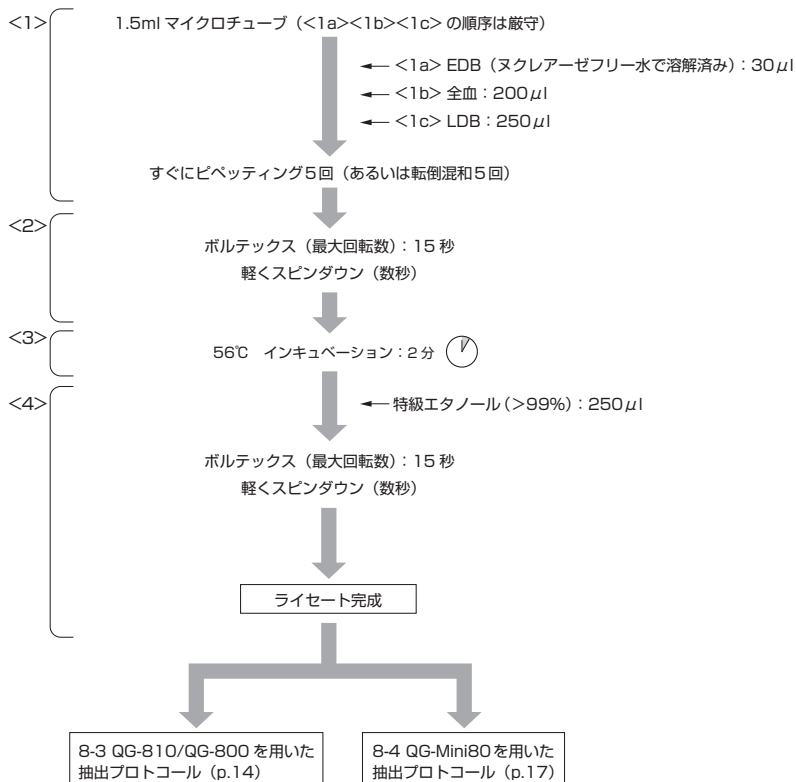
本キットは、1処理あたり全血（200μl）からのゲノムDNAの抽出のみに対応しています。

【抽出を始める前の注意事項】

- 試薬類は室温に戻してから使用してください。
- ヒートブロックまたはウォーターバスを56℃に設定してください（ステップ＜3＞（p.13）で使用します）。
- サンプルおよび試薬の液量はライセート作製フロー（p.12）に記載された液量を厳守してください。
- 抽出の途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- クロスコンタミネーションを防ぐために毎回ピペットチップを交換することをお勧めします。
- LDBを含む溶液や廃液は、絶対に漂白剤と混合しないでください。
- 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので適切な処理を行ってください。

【抽出を始める前の確認事項】

- WDBは濃縮状態でお届けします。抽出を始める前に必ず160mlの特級エタノール（＞99%）が添加されていることを確認してください。

ライセート作製フロー

ライセート作製プロトコール

ライセート作製プロトコール詳細

<1> <1a>から<1c>までの工程の順序は必ずお守りください。EDBを1.5mlマイクロチューブに添加した後、直接LDBを添加しないでください。順序を変えた場合、目的の収量が得られなくなります。

<1a> EDB（ヌクレアーゼフリー水で溶解済み）30μlを1.5mlマイクロチューブの底に添加します。

<1b> 全血200μlを添加します。

全血添加後、直ちに<1c>にお進みください。
長時間放置した場合、目的の収量が得られないことがあります。

<1c> LDB 250μlを添加し、すぐにピペッティングを5回行います。

ピペッティングの代わりに転倒混和を5回行っても構いません。
確実に溶解を行うために、LDB添加後の液を充分に混合することは極めて重要です。
ピペッティング（あるいは転倒混和）を確実に行い、EDB、全血、LDBが充分に混合するようにしてください。

<2> 最大回転数で15秒間ボルテックスします。数秒間スピンダウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します。

ボルテックスは、最大回転数で15秒間確実に行ってください。推奨は、2,500rpm以上です。これ以下の回転数のボルテックスしかお持ちでないときは、<1c>でのピペッティング（あるいは転倒混和）を念入りに行ってください。
混合が不充分の場合、目的の収量が得られないことやカートリッジ（CA）が詰まることがあります。

<3> 56℃で2分間インキュベートします。

インキュベーション時間の延長は、5分までは収量に影響しません。

<4> 特級エタノール（>99%）を250μl添加し、最大回転数で15秒間ボルテックスします。数秒間スピンダウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します（ライセート完成）。

サンプルとエタノールが充分に混合するようにしてください。ボルテックスは、<2>と同様の回転数をご使用ください。

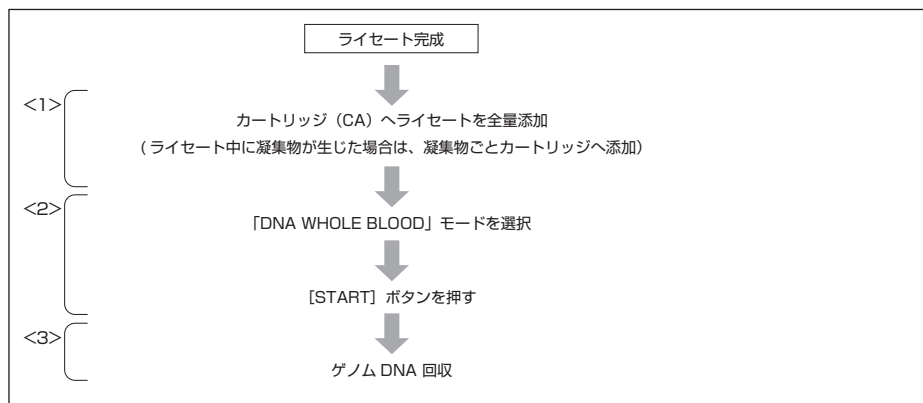
ライセート完成後は、速やかにQuickGeneにて抽出操作を行ってください。

8-3 QG-810/QG-800を用いた抽出プロトコール（p.14）
8-4 QG-Mini80を用いた抽出プロトコール（p.17）

8-3　QG-810/QG-800を用いた抽出プロトコール

- ご使用になる前にQG-810/QG-800の取扱説明書をよくお読みになり、必要な準備をしてください。
- WDBに160mlの特級エタノール（>99%）が添加されていることを確認してください。
- QG-810/QG-800の抽出モードは、「DNA WHOLE BLOOD」モードを選択してください。
- 各試薬、カートリッジおよび各チューブはクリーンルームで生産されております。ご使用の際はヌクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してセットしてください。
- カートリッジ（CA）および各チューブのセットの方法、および各試薬のセットの位置については、QG-810/QG-800の取扱説明書をお読みください。
- QG-810/QG-800のフロントカバーを開けて、専用のコレクションチューブ（CT）、ウェイストチューブ（WT）をチューブホルダ（またはコレクションチューブホルダ）に差し込みます。カートリッジは専用カートリッジ（CA）を使用してください。
- p.10を参考に、WDB（特級エタノール添加済み）、CDBをQG-810/QG-800にセットしてください。
- カートリッジ（CA）の位置がずれていると、液がこぼれたり、抽出操作ができないおそれがあります。
- フロントカバーを閉め、オペレーションパネルの [DISCHARGE] ボタンを押してください。ディスチャージ操作を行わないと、管内の残留エアの影響で規定量のWDB、CDBが注入されず、正確な結果が得られません。

- カートリッジ（CA）内のフィルターにピペットチップが触れないように注意してください。
- LDBを含む溶液や廃液は、絶対に漂白剤と混合しないでください。
- 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので、適切な処理を行ってください。

QG-810/QG-800抽出フロー

QG-810/QG-800抽出プロトコール詳細

＜1＞〈ライセート添加〉8-2（p.11）で調製したライセート全量をカートリッジ（CA）へ添加します。

ライセート中に凝集物が生じた場合は、ピペッティングにより凝集物を浮かせ、全量を凝集物ごとカートリッジへ添加します。
ライセート完成後は、速やかに抽出操作を行ってください。やむを得ず放置される場合は、ライセート完成後30分以内に抽出してください。

＜2＞〈抽出〉抽出モードは、本キット用にパラメータ設定したモードを選択してください。パラメータの確認方法は、付録1、2（p.26、27）を参照してください。QG-810/QG-800のフロントカバーを閉め、オペレーションパネルに適切なモードが表示されていることを確認してから、[START] ボタンを押します。

抽出操作が始まるとオペレーションパネルに「PROCESSING」（QG-810）または「EXECUTING」（QG-800）と表示されます。QG-810をご使用の場合、抽出状況が各ランプ（BINDING、WASHING、ELUTION）の点滅によって確認できます。

ご注意 抽出動作中（「PROCESSING」または「EXECUTING」と表示されているとき）は、フロントカバーを開けないでください。万一開けると、抽出動作が停止し、継続抽出できない場合があります。表4で確認してください。

表4　抽出中にフロントカバーを開けた場合の動作

	QG-810	QG-800
抽出動作	停止	停止
抽出継続	可能*1	不可*2

＊1 QG-810：QG-810 取扱説明書p.29「3.6 抽出処理中にフロントカバーを開いた場合の対処方法」を参照してください。

＊2 QG-800：使用した前処理サンプルは、再度使用することはできませんので廃棄処分してください。サンプルの廃棄に関しては、本書p.6「4．取扱上の安全注意事項 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合」を参照してください。

<3> 〈抽出終了〉ピピーッと音が鳴れば抽出終了です。
オペレーションパネルには抽出結果が表示されます。

表5　抽出結果

	QG-810	QG-800	備　考
正常終了	✓ （チェック）	○	
抽出不良	– （ハイフン）	×	カートリッジの詰まり
カートリッジ未装着	_ （アンダーバー）	▲	カートリッジなしまたは抽出前にエラーが発生

装置が完全に停止していることを確認した後、フロントカバーを開け、チューブホルダ（またはコレクションチューブホルダ）より、コレクションチューブ（CT）を取り出します。
カートリッジ（CA）からのゲノムDNA溶出量は、200μlです。

CDB液量は50μlまで下げられますが、その場合、溶出効率が2割ほど低下する可能性があります。
CDB液量の変更は付録1（p.26 QG-810の場合）または付録2（p.27 QG-800の場合）を参照してください。
全血200μlからの標準的なゲノムDNA収量は、4～8μgです。
すぐにゲノムDNAを使用しない場合は、キャップ（CAP）をしっかりと閉めた後、4℃または－20℃で保存してください。長期間ゲノムDNAを保存される場合、－20℃で保存することをお勧めします。

<4> ウェイストチューブ（WT）を取り出します。ウェイストチューブと廃液を規定に従って捨ててください。カートリッジホルダを取り外し、カートリッジ（CA）も処分します。ディスチャージトレーの廃液も捨ててください。

8-4　QG-Mini80を用いた抽出プロトコール

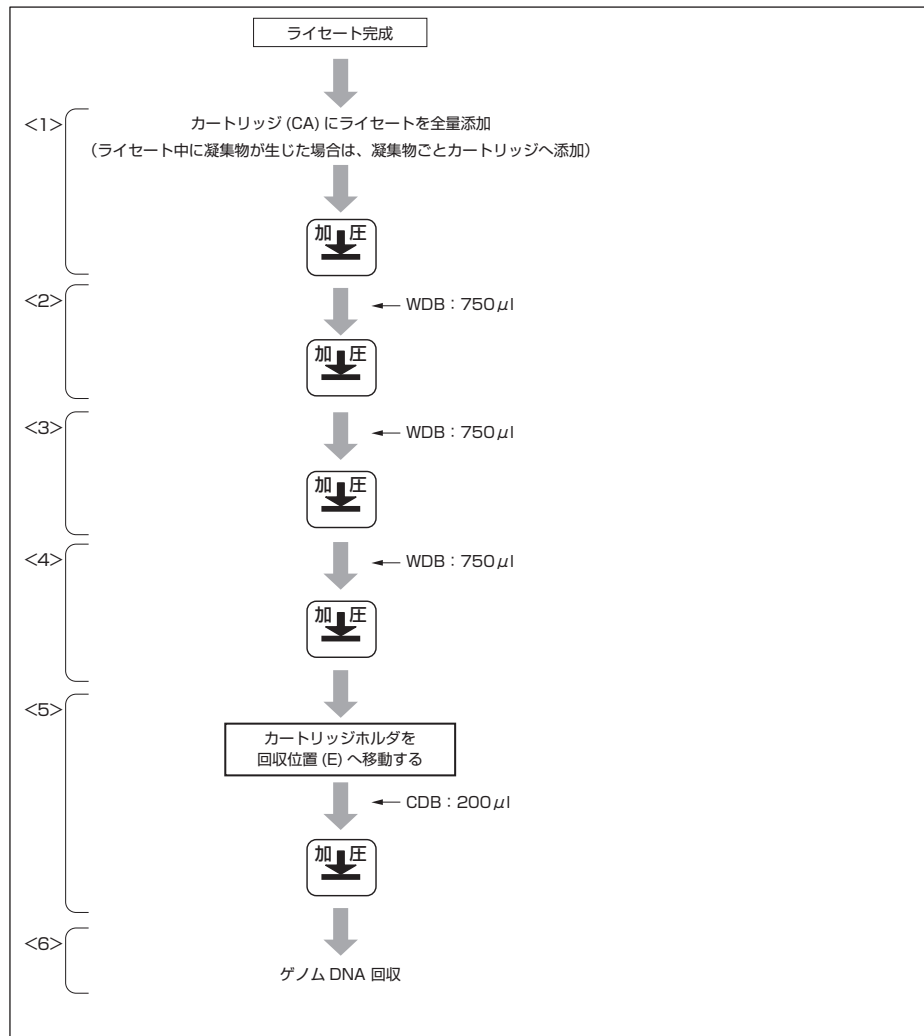
- ご使用になる前にQG-Mini80の取扱説明書をよくお読みになり、必要な準備をしてください。
- WDBに160mlの特級エタノール（>99%）が添加されていることを確認してください。
- チューブホルダにウェイストチューブ（WT）をセットしてください。
- チューブホルダにチューブアダプタを取り付け、コレクションチューブ（CT）をセットしてください。コレクションチューブの代わりに1.5mlマイクロチューブを使用することもできます。この場合、チューブアダプタは不要です。
- カートリッジホルダをチューブホルダの洗浄位置（W）に差し込み、カートリッジ（CA）をセットします。その際、カートリッジホルダ右のリリースレバーが左端に戻っていることを確認してからカートリッジをセットしてください。

- チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQG-Mini80本体にセットする際は、奥に突き当たるまで押し込んでください。
- ライセートおよびWDB（特級エタノール添加済み）を加圧する際は、QG-Mini80本体トレイ上のWASHラベルが完全に見えていることを確認してください。
- CDBを加圧する際は、QG-Mini80本体トレイ上のWASHラベルがチューブホルダの下に隠れて見えないことを確認してください。

- カートリッジ（CA）内のフィルターにピペットチップが触れないように注意してください。
- LDBを含む溶液や廃液は、絶対に漂白剤と混合しないでください。
- 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので、適切な処理を行ってください。

QG-Mini80抽出フロー

抽出フロー中の加圧マーク［加圧］は下記操作を意味しています。

① チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQG-Mini80本体にセットする
② 加圧スイッチを手前に回して加圧開始
③ カートリッジ（CA）内に液が残っていないことを確認してから加圧スイッチを元の位置に戻す
④ チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQG-Mini80本体から取り出す

QG-Mini80抽出プロトコール

QG-Mini80抽出プロトコール詳細

＜1＞〈ライセート添加〉8-2（p.11）で調製したライセート全量をカートリッジ（CA）へ添加します。チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQG-Mini80本体にセットします。その際、本体トレイ上のWASHラベルが完全に見えていることを確認してください。QG-Mini80本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。ライセートがカートリッジ内に残っていないことを確認し、加圧スイッチを元の位置に戻します。

ライセート中に凝集物が生じた場合は、ピペッティングにより凝集物を浮かせ、全量を凝集物ごとカートリッジへ添加します。

ライセート完成後は、速やかに抽出操作を行ってください。やむを得ず放置される場合は、ライセート完成後30分以内に抽出してください。

加圧はおよそ1分で自動的にストップします。加圧が自動的にストップした後もライセートがカートリッジ内に残っている場合は、加圧スイッチをいったん元の位置に戻し、再度加圧スイッチを手前に回して加圧を行ってください。

＜2＞〈洗浄1回目〉チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）を引き出し、WDB 750μlをカートリッジ（CA）へ添加します。チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQG-Mini80本体にセットします。その際、本体トレイ上のWASHラベルが完全に見えていることを確認してください。QG-Mini80本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。WDBがカートリッジ内に残っていないことを確認し、加圧スイッチを元の位置に戻します。

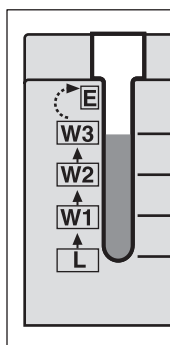
加圧はおよそ1分で自動的にストップします。加圧が自動的にストップした後もWDBがカートリッジ内に残っている場合は、加圧スイッチをいったん元の位置に戻し、再度加圧スイッチを手前に回して加圧を行ってください。

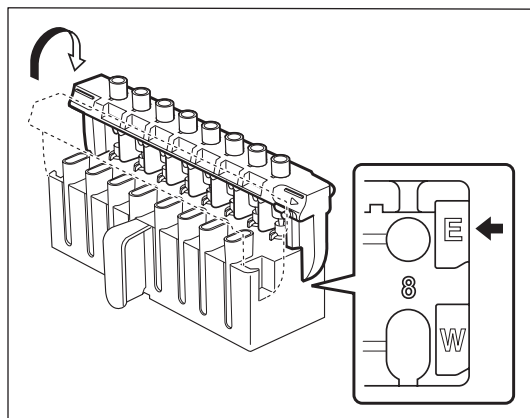
＜3＞〈洗浄2回目〉チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）を引き出し、WDB 750μlをカートリッジ（CA）へ添加します。チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQG-Mini80本体にセットします。その際、本体トレイ上のWASHラベルが完全に見えていることを確認してください。QG-Mini80本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。WDBがカートリッジ内に残っていないことを確認し、加圧スイッチを元の位置に戻します。

加圧はおよそ1分で自動的にストップします。加圧が自動的にストップした後もWDBがカートリッジ内に残っている場合は、加圧スイッチをいったん元の位置に戻し、再度加圧スイッチを手前に回して加圧を行ってください。

<4>〈洗浄3回目〉チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）を引き出し、WDB 750 μlをカートリッジ（CA）へ添加します。チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQG-Mini80本体にセットします。その際、本体トレイ上のWASHラベルが完全に見えていることを確認してください。QG-Mini80本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。WDBがカートリッジ内に残っていないことを確認し、加圧スイッチを元の位置に戻します。

加圧はおよそ1分で自動的にストップします。加圧が自動的にストップした後もWDBがカートリッジ内に残っている場合は、加圧スイッチをいったん元の位置に戻し、再度加圧スイッチを手前に回して加圧を行ってください。
3回目のWDBの加圧終了後、チューブホルダの廃液目盛りの廃液高さは「W3」の位置になります（下記イラスト参照）。
4回以上WDBを添加しないでください。カートリッジに廃液が付着してコンタミネーションを起こしたり、ウェイストチューブ（WT）から廃液があふれたりすることがあります。

QG-Mini80抽出プロトコール

<5>〈回収〉チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）を引き出し、リリースレバーに触れないように注意しながら、カートリッジホルダを回収位置（E）に移動します（下記イラスト参照）。CDB 200μlをカートリッジ（CA）へ添加し、チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQG-Mini80本体にセットします。その際、本体トレイ上のWASHラベルがチューブホルダの下に隠れて見えなくなっていることを確認してください。
QG-Mini80本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。CDBがカートリッジ内に残っていないことを確認し、加圧スイッチを元の位置に戻します。

加圧はおよそ1分で自動的にストップします。加圧が自動的にストップした後もCDBがカートリッジ内に残っている場合は、加圧スイッチをいったん元の位置に戻し、再度加圧スイッチを手前に回して加圧を行ってください。
CDB液量は50μlまで下げられますが、その場合、溶出効率が2割ほど低下する可能性があります。

<6> チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）を引き出します。チューブホルダからカートリッジホルダをはずし、カートリッジ（CA）を捨てます。カートリッジホルダ右のリリースレバーを右端にスライドさせるとカートリッジが落下します。コレクションチューブ（CT）を取り出し、専用チューブラック（別売）にコレクションチューブを並べ、キャップ（CAP）をしっかりと閉めます。専用チューブラックをお持ちでない場合は、キャップを閉めてから、コレクションチューブを取り出してください。コレクションチューブの代わりに1.5mlマイクロチューブを使用した場合は、1.5mlマイクロチューブの蓋をしっかりと閉めてから取り出してください。ウェイストチューブ（WT）と廃液を規定に従って捨ててください。

全血200μlからの標準的なゲノムDNA収量は、4～8μgです。
すぐにゲノムDNAを使用しない場合は、キャップまたは1.5mlマイクロチューブの蓋をしっかりと閉めた後、4℃または−20℃で保存してください。長期間ゲノムDNAを保存される場合、−20℃で保存することをお勧めします。

9. トラブルシューティング

トラブルが生じた場合には、以下の対策を参照してください。

(*)：QG-810/QG-800をご使用の場合
(**)：QG-Mini80をご使用の場合

(1) DNAの収量が低い、DNAが得られない

原　因	対　策
全血の保存方法が不適切	全血は、できる限り採血後3日以内のものを使用してください。長期間保存した後の血液を用いた場合、収量の低下やDNAの分解が生じることがあります。
EDBの溶解が不充分	ヌクレアーゼフリー水を添加後、時々攪拌しながら室温に30分以上置き、粉末が完全に溶解していることを確認してから使用してください。
EDBの酵素活性が不充分	溶解したEDBは冷蔵（4℃）で保存する場合、2カ月間安定です。2カ月以上保存されたEDBは使用しないでください。溶解後のEDBを－20℃に保存することで、酵素の安定期間を長くすることが可能です。その場合は少量ずつ分注するなどして、凍結、解凍の繰り返しは避けてください。
試薬、全血の添加順序が不適切	ライセート調製時、1.5ml マイクロチューブには、EDB（ヌクレアーゼフリー水3.3mlで溶解済み）→全血→LDBの順で添加してください。
全血量が不適切	全血量が多すぎる場合は、所定量（200μl）まで減らしてください。全血量が所定量（200μl）以下の場合には、PBS等で希釈して200μlになるように調製してください。
白血球数が多すぎる	白血球数が2×10^6個を超えた場合、DNA収量が低下することがあります。その場合は、PBS等で希釈して2×10^6個以下になるように調製してください。
LDB添加後のホモジナイズが不充分	LDB添加直後に、ピペッティング（あるいは転倒混和）を行い、その後充分にボルテックス（15秒）してください。ボルテックスは最大回転数（2,500rpm以上推奨）で行ってください。
ライセート作製時、特級エタノールを所定量添加していない	特級エタノール（>99%）を所定量添加してください。
特級エタノール添加後のホモジナイズが不充分	エタノール添加後、充分にボルテックス（15秒）してください。ボルテックスは最大回転数（2,500rpm以上推奨）で行ってください。
WDBに所定量の特級エタノールを添加していない	WDB使用前には、必ず所定量の特級エタノール（>99%）を添加したことを確認してください。（8-1 p.9参照）
カートリッジ（CA）へライセート全量を添加しきれていない	ライセートに凝集物が見られた場合は、凝集物も含めて全量をカートリッジに添加してください。
CDB量が不適切（**）	CDB量が50μl以上であることを確認してください。
フィルターが破れてしまった	カートリッジ（CA）内のフィルターにピペットチップが触れないように注意してください。
必要以上の加圧を行った（**）	ライセートやWDBがカートリッジ（CA）から抜けたら、できるだけすぐに加圧をやめてください。
カートリッジ（CA）内の液が抜けた後放置した（**）	QuickGeneでの抽出を始めたら、途中で放置せずに最後まで続けてください。
ゲノムDNAの溶出にCDB以外の試薬を使った	ゲノムDNA溶出時にはCDBを使用してください。
古いWDBを使用した（*）	QG-810/QG-800に1日以上セットされたWDBは使用しないでください。

原　因	対　策
DNAの分解	(3)「DNAが分解した」参照
セット試薬の不足(*)	QG-810/QG-800にセットした試薬が充分であることを確認してください。

(2) カートリッジ(CA)が詰まった

原　因	対　策
全血量が多すぎる	所定量(200μl)まで全血量を減らしてください。
白血球数が多すぎる	白血球数が5×10^{6}個を超えた場合、カートリッジ(CA)が目詰まりを起こす可能性があります。2×10^{6}個を超えた場合、収量が低下しますのでPBS等で希釈して2×10^{6}個以下になるように調製して抽出を行うことをお勧めします。
LDB添加後のホモジナイズが不充分	LDB添加直後に、ピペッティング(あるいは転倒混和)を充分行い、その後充分にボルテックス(15秒)してください。ボルテックスは最大回転数(2,500rpm以上推奨)で行ってください。
特級エタノール添加後のホモジナイズが不充分	特級エタノール添加後充分にボルテックス(15秒)してください。ボルテックスは最大回転数(2,500rpm以上推奨)で行ってください。

(3) DNAが分解した

原　因	対　策
全血の保存方法が不適切	全血は、できる限り採血後3日以内のものを使用してください。長期間保存した血液を用いた場合、収量の低下や、DNAの分解が生じることがあります。

(4) DNAの純度が低い

原　因	対　策
全血の保存方法が不適切	全血は、できる限り採血後3日以内のものを使用してください。長期間保存した血液を用いた場合、収量の低下や、DNAの分解が生じることがあります。
EDBの酵素活性が不充分	溶解したEDBは冷蔵(4℃)で保存する場合、2カ月間安定です。2カ月以上保存されたEDBは使用しないでください。溶解後のEDBを−20℃に保存することで、酵素の安定期間を長くすることが可能です。その場合は少量ずつ分注するなどして、凍結、解凍の繰り返しは避けてください。
試薬、全血の添加順序が不適切	ライセート調製時、マイクロチューブには、EDB(ヌクレアーゼフリー水3.3mlで溶解済み)→全血→LDBの順で添加してください。
LDB添加後のホモジナイズが不充分	LDB添加直後に、ピペッティング(あるいは転倒混和)を行い、その後充分にボルテックス(15秒)してください。ボルテックスは最大回転数(2,500rpm以上推奨)で行ってください。
ライセート作製時、特級エタノールを所定量添加していない	特級エタノール(>99%)を所定量添加してください。
特級エタノール添加後のホモジナイズが不充分	特級エタノール添加後充分にボルテックス(15秒)してください。ボルテックスは最大回転数(2,500rpm以上推奨)で行ってください。
WDBに所定量の特級エタノールを添加していない	WDB使用前には、必ず所定量の特級エタノール(>99%)を添加したことを確認してください。(8-1 p.9参照)

原　因	対　策
所定の洗浄条件で行っていない(**)	洗浄はWDB(特級エタノール添加済み)750μlで3回行ってください。
ゲノムDNAの溶出にCDB以外の試薬を使った	ゲノムDNA溶出時にはCDBを使用してください。

(5) PCRなど、続けて行う実験がうまくいかない

原　因	対　策
使用したDNA量が不適切	260nm吸光度から濃度を確認してください。
DNAの純度が低い	(4)「DNAの純度が低い」参照
DNAの分解	(3)「DNAが分解した」参照

(6) 試薬に析出物が生じた

原　因	対　策
低温で保存している	指定の温度(15～28℃)で保存してください。 析出物が生じた場合は、37℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

(7) コレクションチューブ(CT)または1.5mlマイクロチューブにサンプルが回収されない(空である)

原　因	対　策
CDBのセット量が不足またはディスチャージ操作を行っていない(*)	表3(p.10)に従い、必要量のCDBをセットしてください。また、QG-810/QG-800の取扱説明書を参照してディスチャージ操作を必ず行ってください。
CDBを添加していない(**)	カートリッジホルダを回収位置(E)に移動させた後、CDBを200μl添加してください。
CDB添加の際、カートリッジホルダを回収位置(E)に移動させていない(**)	CDB添加時は必ずカートリッジホルダをチューブホルダの回収位置(E)に移動させてから添加を行ってください。

(8) カートリッジ(CA)がカートリッジホルダに保持されない

原　因	対　策
カートリッジホルダ右のリリースレバーが左端に戻っていない(**)	リリースレバーが左端に戻っていることを確認してからカートリッジ(CA)をセットしてください。

10.　オーダリング・インフォメーション

製　　品	Cat #
QuickGene DNA tissue kit S	DT-S
QuickGene DNA組織キット	
QuickGene DNA whole blood kit S	DB-S
QuickGene DNA全血キット	
QuickGene RNA tissue kit S Ⅱ	RT-S2
QuickGene RNA組織キットⅡ	
QuickGene RNA cultured cell kit S	RC-S
QuickGene RNA培養細胞キット	
QuickGene RNA cultured cell HC kit S	RC-S2
QuickGene RNA培養細胞HCキット	
QuickGene RNA blood cell kit S	RB-S
QuickGene RNA血液細胞キット	
QuickGene Plasmid kit S	PL-S
QuickGene プラスミドキット	

付録1 QG-810パラメータについて

QG-810をご使用の方は、「DNA WHOLE BLOOD」モードを選択してください。パラメータは下表の通りです。

表示順	LCD表示	パラメータ
1	BIND PEAK	120
2	WASH COUNT	3
3	WASH PEAK	110
4	WASH VOL1	750
5	WASH VOL2	750
6	WASH VOL3	750
7	WASH VOL4	750
8	WASH VOL5	750
9	WASH DIP TM	0
10	WAS2 WAIT T	0
11	WAS2 COUNT	0
12	WAS2 PEAK	110
13	WASH VOL1	750
14	WASH VOL2	750
15	WASH VOL3	750
16	WASH VOL4	750
17	WASH VOL5	750
18	ELUT VOL	200
19	ELUT PEAK	100
20	ELUT DIP TM	0

※ CDB量を50μlにする場合は「ELUT VOL」パラメータを「50」に変更してください。
なお、パラメータの変更方法はQG-810の取扱説明書をご参照ください。

付録2 QG-800パラメータについて

QG-800をご使用の方は、「DNA WHOLE BLOOD」モードを選択してください。パラメータは下表の通りです。

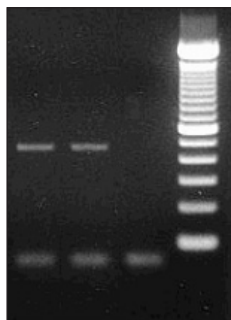
表示順	動作項目	パラメータ
1	SAMP PEAK	120
2	WASH COUNT	3
3	WASH PEAK	110
4	WASH VOL1	750
5	WASH VOL2	750
6	WASH VOL3	750
7	WASH VOL4	750
8	WASH VOL5	750
9	WAS2 COUNT	0
10	WAS2 PEAK	110
11	WAS2 VOL1	750
12	WAS2 VOL2	750
13	WAS2 VOL3	750
14	WAS2 VOL4	750
15	WAS2 VOL5	750
16	CLCT VOL	200
17	CLCT PEAK	120

※ CDB量を50μlにする場合は「CLCT VOL」パラメータを「50」に変更してください。
なお、パラメータの変更方法はQG-800の取扱説明書をご参照ください。

付録3 QuickGene DNA whole blood kit S (DB-S) データ例

● PCR

図1は本キットを用いて抽出したゲノムDNAでPCRを行った例を示す
本キットを用いて全血200μlから抽出したゲノムDNA 0.1ngでG3PDHをターゲットにPCRを行った。

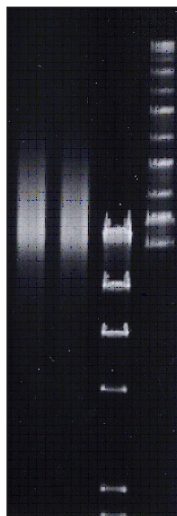
図1

番号	サンプル
1	全血200μl(QG-800使用)
2	全血200μl(QG-Mini80使用)
3	Negative control

M：マーカー（100bp DNA Ladder：Invitrogen社製)
泳動条件：2% Agarose gel/1×TAE

このPCR結果では、ゲノムDNAテンプレート量0.1ngのPCRで、増幅産物の電気泳動バンドが検出された。

● パルスフィールド電気泳動

図2は本キットを用いて抽出されたゲノムDNAの長さを示す。

図2

番号	サンプル
1	本キットを用いて全血200μlから抽出したゲノムDNA (QG-800使用)
2	本キットを用いて全血200μlから抽出したゲノムDNA (QG-Mini80使用)

M1：λ- Hind Ⅲ digest
M2：MidRange PFG MakerⅡ (NEB)
泳動条件：1% Agarose gel/0.5×TBE

この結果から、本キットを用いて抽出したゲノムDNAは約140kbまでの長さがあることが分かる。

FUJIFILM

HANDBOOK

QuickGene DNA whole blood kit S (DB-S)

For extraction of genomic DNA from whole blood

Ver.2.1

Contents

Warning For research use only.
Not recommended or intended for diagnostic or clinical application for humans or animals.

1. Introduction

FUJIFILM Corporation developed and patented an evolutionary, porous membrane to immobilize nucleic acid. Because of its large specific surface area and uniform & fine porousness, QuickGene successfully extracts genomic DNA with high yield; moreover, with its patented thin membrane, it eliminates most contaminants. QuickGene also uses pressured filtration technology, which cannot be successfully utilized with typical glass membranes; by using pressured filtration technology, new, compact and automatic instruments for rapid nucleic acid purification can be produced successfully.

When using this kit with QuickGene, high quality and high yield genomic DNA can be extracted and also purified from whole blood. No hazardous organic solvents such as phenol and chloroform are used. DNA from 8 sets of whole blood lysate samples can be simultaneously extracted in following time.
QuickGene-810/QuickGene-800 (QG-810/QG-800) : about 6 min
QuickGene-Mini80 (QG-Mini80) : about 6 min
The purified, high quality genomic DNA is suitable for PCR, restriction enzyme digestion, Southern blotting and other applications.

Please be sure to read the User's Guide of QuickGene carefully before using this kit.

2. Kit Components and Storage Conditions

2-1 Kit Components (96 Preps)

☐ Protease	EDB	1 vial
☐ Lysis Buffer	LDB	30 ml
☐ Wash Buffer	WDB	160 ml
☐ Elution Buffer	CDB	100 ml
☐ Cartridges	CA	96
☐ Collection Tubes	CT	96
☐ Caps	CAP	96
☐ Waste Tubes	WT	96

2-2 Storage Conditions

All reagents are stable for one year after purchase at room temperature (15-28°C). Reconstituted EDB is stable for 2 months when stored at 4°C. Storage at –20°C will prolong the life of EDB, but repeated freezing and thawing should be avoided. Dividing the solution into aliquots and storage at –20°C is recommended.

3. Other Required Materials, Not Supplied in This Kit

[1] Reagents

- >99% Ethanol (for preparation of lysate and WDB working solution)
- Nuclease-free water (for dissolving EDB)

[2] Equipments

- QuickGene
- Centrifuge tubes * (Large/Small sets)
- Micropipettes and tips
- 1.5 ml microtubes
- Tube stand
- Vortex mixer (maximum speed at 2,500 rpm or more)
- Benchtop microcentrifuge
- Heat block or water bath (at 56°C)

  *Centrifuge tubes are used with QG-810/QG-800 as containers for WDB (>99% ethanol added) and CDB. They are unnecessary when QG-Mini80 is used.

Recommendation product of centrifuge tubes are following Table 1.
Use centrifuge tubes according to the number of Cartridges to use.

Table 1 Recommended centrifuge tubes (In case of QG-810/QG-800)

Size of Buffer Stand (Centrifuge Tube Holder)	The number of Cartridges	Type of centrifuge tube	Product name (Examples)
Standard	-16	Large centrifuge tube (for WDB)	BD Falcon™ 50 ml conical tube
		Small centrifuge tube (for CDB)	BD Falcon™ 15 ml conical tube
Large	-72	Large centrifuge tube (for WDB)	BD Falcon™ 175 ml conical tube
		Small centrifuge tube (for CDB)	BD Falcon™ 50 ml conical tube

4. Safety Warnings

Warning For research use only.
Not recommended or intended for diagnostic or clinical application for humans or animals.

- All reagents and items should be considered chemically and biologically hazardous. Wearing a laboratory coat, disposable gloves and safety goggles during the experiments are highly recommended. In case of contact between the reagents and the eyes, skin, or clothing, wash immediately with water.
  (See the Material Safety Data Sheet for specific recommendations, http://lifescience.fujifilm.com/)

◆ Protease EDB
- Do not drink or ingest. Avoid contact with eyes.
- If contact with eyes, skin, or clothing occurs, rinse thoroughly with water. Consult a physician if necessary.

◆ LDB (Lysis Buffer)
- **Harmful if ingested.**
- Do not drink or ingest. Avoid contact with eyes.
- If contact with eyes, skin, or clothing occurs, rinse thoroughly with water. Consult a physician if necessary.
- Wear a laboratory coat, gloves and safety goggles during experiments.

◆ WDB (Wash Buffer)
- Do not drink or ingest. Avoid contact with eyes.
- If contact with eyes, skin, or clothing occurs, rinse thoroughly with water. Consult a physician if necessary.

◆ CDB (Elution Buffer)
- Do not drink or ingest. Avoid contact with eyes.
- If contact with eyes, skin, or clothing occurs, rinse thoroughly with water. Consult a physician if necessary.

◆ Use or storage of LDB at high temperature should be avoided.

◆ Any solution and waste fluid containing LDB should not be mixed with bleach.

◆ **In the case of using potentially infectious samples :**
Wear a suitable laboratory coat, disposable gloves and safety goggles during the experiments.

◆ **Disposal of waste fluid and consumables when using potentially infectious samples :**
After use, dispose of potentially infectious samples and consumables by incineration, high-temperature decontamination, sterilization, or disinfection in accordance with applicable laws. When entrusting waste disposal to licensed hazardous waste disposal contractors, use specially controlled waste management forms (manifest), if applicable.

5. Precautions

◆ Handling of Starting Material

- Small amount of samples should be adjusted to 200 μl with PBS (sterilized) before loading.
- Use a whole blood sample treated with EDTA-2Na, EDTA-2K, or heparin.
- Use a whole blood sample within 3 days after collection. The yield of DNA might decrease, or degradation of DNA might be caused when a blood sample preserved for a long time is used.
- The yield of DNA might decrease when the number of leucocytes exceeds 2×10^6 cells/200 μl. In such cases, adjust the number of leucocytes by diluting the sample with PBS (sterilized) to below 2×10^6 cells/200 μl.
  The Cartridge (CA) might clog when the number of leucocytes exceeds 5×10^6 cells/200 μl. We recommend that you dilute the sample with PBS (sterilized) and then perform extraction.

◆ Use of Reagent

- After addition of nuclease-free water to EDB leave it for 30 min or more at room temperature with occasionally stirring. Use it after confirming the powder is completely dissolved. The yield of DNA might decrease or the Cartridge (CA) might clog when dissolution of EDB is insufficient.

◆ Procedure of Extraction

- Use QuickGene DNA whole blood kit S (DB-S) at room temperature (15-30°C). In case of using at lower or higher temperature, it may affect the extraction performance.
- Use a vortex mixer able to stir at 2,500 rpm or more. Weak vortex may cause insufficient dissolution, lead to decrease of the yield of DNA or clogging of the Cartridge (CA).
- During the procedure, work quickly without interruption.
- The yield of DNA varies depending upon sample conditions. The standard yield is 4 to 8 μg from 200 μl whole blood samples.
- We recommend starting preparation of lysate after setup of QuickGene. Refer to the following pages.
  QG-810/QG-800 : 8-3 (p.14), Appendix 1 (p.26), Appendix 2 (p.27)
  QG-Mini80 : 8-4 (p.17)
- Refer to QuickGene User’s Guide for details.

6. Quality Control

- As part of the stringent quality assurance program in FUJIFILM Corporation, the performance of QuickGene DNA whole blood kit S (DB-S) is evaluated routinely on a lot-to-lot uniformity.
- Yield and quality of extracted genomic DNA are checked by measuring the absorbance at 260 nm, ratio of absorbance (260 nm/280 nm). Moreover, the ability of PCR amplification is guaranteed.

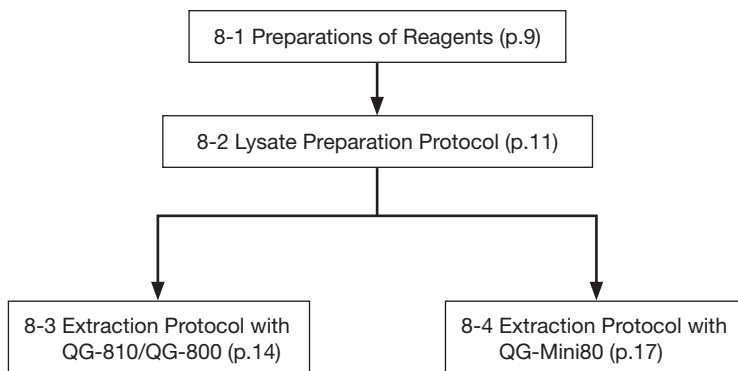
7. Product Description

DNA and RNA are included in eluate extracted with this kit. Table 2 shows the average of yield and purity (A260/280) of genomic DNA extracted from 200 µl of whole blood samples.
The yield varies depending upon sample conditions.

Table 2

Sample	Amount of genomic DNA (µg)	A260/280
Whole blood (200 µl)	4-8	1.97

8. Protocol

[Overview Flow Chart]

8-1 Preparations of Reagents

◆ EDB (Lyophilized)

When using EDB, pipette 3.3 ml of nuclease-free water into the vial containing lyophilized Protease. Dissolve it completely. Reconstituted EDB is stable for 2 months when stored at 4°C. Storage at –20°C will prolong the life of EDB, but repeated freezing and thawing should be avoided. Dividing the solution into aliquots and storage at –20°C is recommended.

Notices Dissolve EDB completely by the following method, and then use the solution.
Add 3.3 ml of nuclease-free water, close the cap and mix with inversion the bottle.
Leave it for 30 min or more at room temperature with occasionally stirring it. Use it after confirming the powder is completely dissolved. The yield of DNA might decrease or the Cartridge (CA) might clog when dissolution of EDB is insufficient.

◆ LDB (30 ml)

Mix thoroughly before use.
If the precipitates are formed, dissolve them fully by incubation at 37°C. Cool down it to room temperature before use.

◆ WDB (160 ml)

WDB is supplied as a concentrate.
Add 160 ml of >99% ethanol into the bottle and mix by gently inverting the bottle before use. After adding ethanol, enter a check in the [ethanol added?] check box on bottle cap label. Close the cap firmly to prevent volatilizing.

◆ CDB (100 ml)

Use CDB for elution of genomic DNA.

◆ **Required volume of WDB (>99% ethanol added) and CDB (In the case of using QG-810/ QG-800)**
Prepare the required volume of WDB and CDB into the tubes (see Table 1 p.5) : set them to Buffer Stand.

Table 3 Required volume of WDB and CDB

Number of Cartridges	WDB (QG-810/QG-800)	CDB (QG-810)	CDB (QG-800)
8	26 ml	9 ml	8 ml
16	44 ml	11 ml	11 ml
24	62 ml	13 ml	13 ml
32	80 ml	15 ml	15 ml
40	99 ml	17 ml	17 ml
48	117 ml	19 ml	19 ml
56	135 ml	21 ml	21 ml
64	154 ml	22 ml	22 ml
72	172 ml	24 ml	24 ml

*Required volume of discharge
QG-810 : WDB 8.0 ml, CDB 7.4 ml
QG-800 : WDB 8.0 ml, CDB 6.4 ml
Depending on the number of the Cartridges, add WDB and CDB.
Use WDB 2.25 ml and CDB 200 μl per 1 Cartridge.
For example, in case of using 2 Cartridges, 12.5 ml of WDB, 7.8 ml of CDB (QG-810) and 6.8 ml of CDB (QG-800) are required.
*Use appropriate tubes according to Table 1 (p.5).

8-2 Lysate Preparation Protocol

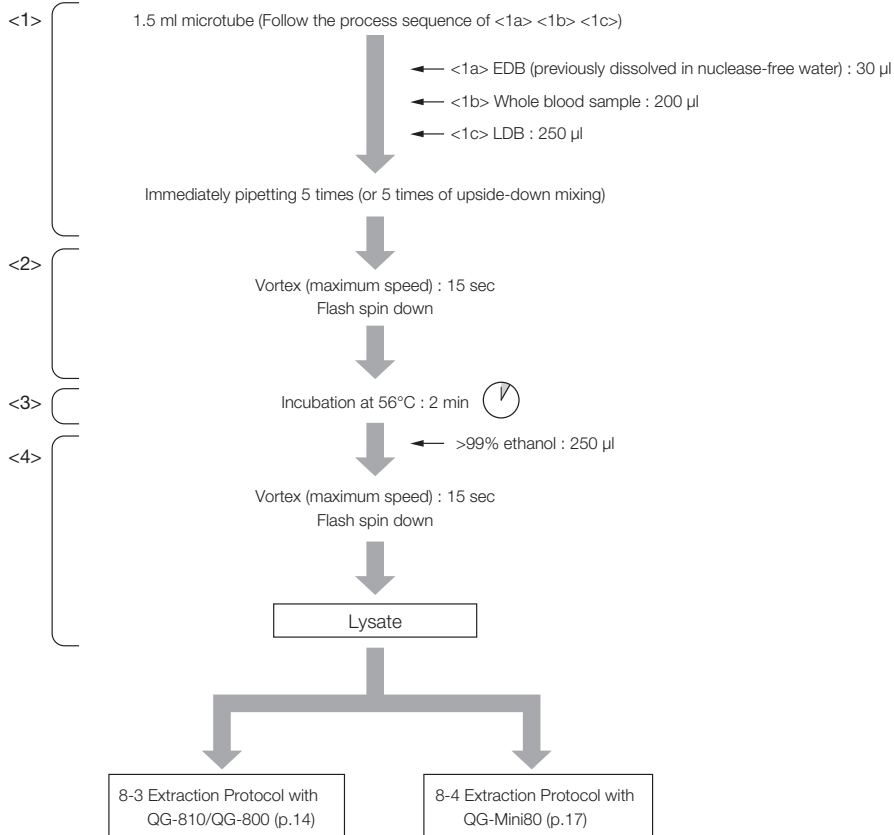
QuickGene DNA whole blood kit S (DB-S) corresponds to the extraction of genomic DNA from 200 μl of whole blood sample per each treatment.

[Important notes before starting]

- Cool down all reagents to room temperature before use.
- Set the temperature of a heat block or a water bath to 56°C (it is used in step <3> p.13).
- Follow the volume of samples and buffers described in the workflow (p.12).
- During the procedure, work quickly without interruption.
- To prevent cross-contamination, it is recommended to change the pipette tips between all liquid transfers.
- Any solution and waste fluid containing LDB should not be mixed with bleach.
- When using potentially infectious samples for experiments, dispose them according to the applicable regulations.

[Preparations for starting the experiment]

- WDB is supplied as a concentrate. Check that 160 ml of >99% ethanol is added to WDB before starting an experiment.

Lysate Preparation Workflow

Details of Lysate Preparation Workflow

<1> Follow the protocol of <1a> to <1c> exactly. Do not add LDB directly after addition of EDB to a 1.5 ml microtube. In case the procedure is changed, the yield of DNA may not be obtained.

<1a> Add 30 µl of EDB (previously dissolved in nuclease-free water) to the bottom of a 1.5 ml microtube.

<1b> Add 200 µl of a whole blood sample.

After adding the whole blood, immediately proceed to step <1c>.
Leaving the samples for a long time before addition of LDB might decrease the yield of DNA.

<1c> Add 250 µl of LDB, then immediately pipette 5 times.

Instead of pipetting, mixing upside-down 5 times can be performed.
In order to ensure efficient lysis, it is essential to mix throughly the sample and LDB. Pipette (or mix upside-down) surely in order to mix EDB, whole blood sample and LDB efficiently.

<2> Vortex at the maximum speed for 15 sec. Flash spin down for several seconds to remove drops from the inside of the lid.

Surely vortex for 15 sec at the maximum speed. The speed of 2,500 rpm or more is recommended. If you do not have such a vortex mixer, pipette (or mix upside-down) completely at step <1c>.
In case mixing is insufficient, the yield of DNA might decrease or the Cartridge (CA) might clog.

<3> Incubate at 56°C for 2 min.

Prolongation of the incubation time up to 5 min does not affect the yield.

<4> Add 250 µl of >99% ethanol, and vortex at the maximum speed for 15 sec. Flash spin down for several seconds to remove drops from the inside of the lid.

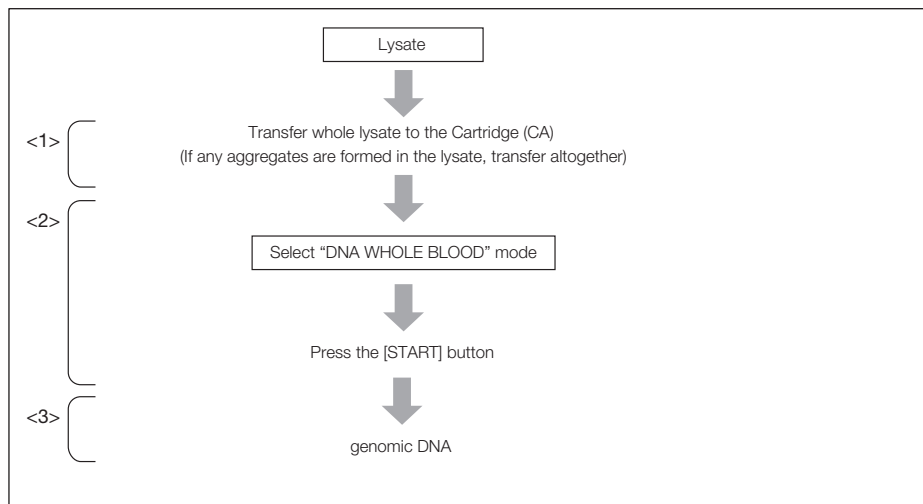
Mix the sample and the ethanol enough. Vortex at the same speed as in step <2>.

Perform the extraction operation quickly after completion of lysis.
QG-810/QG-800 (p.14)
QG-Mini80 (p.17)

8-3 Extraction Protocol with QG-810/QG-800

- Please read the User's Guide of QG-810/QG-800 for the details before using the system.
- Check that 160 ml of >99% ethanol is added to WDB before starting an experiment.
- Select "DNA WHOLE BLOOD" mode as the extraction mode for QG-810/QG-800.
- All reagents, Cartridges (CA) and tubes are manufactured in clean rooms. Wear gloves during the experiments to avoid nuclease contamination.
- Refer to the User's Guide of QG-810/QG-800 for the details of setting Cartridges (CA), tubes and each reagent.
- Open the front cover of QG-810/QG-800 and set the Collection Tubes (CT) and the Waste Tubes (WT) in the Tube Holder (or Collection Tube Holder). Use the specified Cartridges (CA).
- Set WDB (>99% ethanol added) and CDB to QG-810/QG-800 referring to p.10.
- Incorrect Cartridge (CA) placement may result in the solution spilling or improper extraction.
- Press the [DISCHARGE] button after closed the front cover of QG-810/QG-800. Because of air in the lines, incorrect volume of reagents may occur without discharge operation.

- Avoid touching the filter in the Cartridge (CA) with the pipette tip.
- Any solution and waste fluid containing LDB should not be mixed with bleach.
- When using potentially infectious samples for experiments, dispose them according to the applicable regulations.

QG-810/QG-800 Workflow

Details of QG-810/QG-800 Workflow

<1> <Applying lysate> Carefully transfer the whole lysate (See section 8-2 p.11) to the each Cartridge (CA).

If any aggregates are formed in the lysate, transfer altogether with the aggregates to the Cartridge.
Perform the extraction operation quickly after completion of lysate. It is possible to leave it until 30 min if necessary.

<2> <Extraction> Select the appropriate mode for this kit. In case of confirming the setting of parameter, refer to Appendix 1 (p.26), Appendix 2 (p.27). Close the front cover of QG-810/QG-800. Confirm the appropriate mode on the operation panel and press the [START] button.

The operation panel shows “PROCESSING” (QG-810) or “EXECUTING” (QG-800) during extracting. In case of using QG-810, extraction progress can be checked by blinking of each lamp (BINDING, WASHING, ELUTION).

Warning Do not open the front cover during the extraction process (while “PROCESSING” or “EXECUTING” is shown on the operation panel). If the front cover is opened, the extraction process will be halted. Confirm it by Table 4.

Table 4 Movement when you opened a front cover during extraction

	QG-810	QG-800
Extraction process	Stop	Stop
Extraction continuation	Possible*1	Impossible*2

*1 QG-810 : See User’s Guide of QG-810, “3.5 Operations to Restart Program from Pause” (p.28).
*2 QG-800 : The sample that was on the way of the extraction cannot be used again. Discard according to the applicable regulations. Refer to “Disposal of waste fluid and consumables when using potentially infectious samples” of this handbook (p.6).

<3> <Extraction completion>

Operation panel displays the extraction results.

Table 5 Extraction result

	QG-810	QG-800	Remarks
Successfully extracted	v (Check)	○	
Extraction failure	- (Hyphen)	×	Cartridge is clogged
No Cartridge, or No sample	_ (Underscore)	▲	No Cartridge or occurrence of error before extraction

Open the front cover and remove the Collection Tubes (CT) from the Tube Holder after QG-810/QG-800 completely stopped.
The volume of the eluate from each Cartridge will be 200 μl.

The volume of CDB can be reduced to 50 μl, but in that case, elution efficiency might decrease by about 20%.
Refer to Appendix 1 (p.26 for QG-810) or Appendix 2 (p.27 for QG-800) to change the volume of CDB.
The standard yield is 4 to 8 μg from 200 μl of whole blood samples.
Cover with the Caps (CAP) on the Collection Tubes (CT) tightly, store at 4°C or –20°C.
In case of storing genomic DNA for a long time, it is recommended to preserve at –20°C.

<4> Remove the Waste Tubes (WT) and dispose the waste fluid according to applicable regulations.
Remove the Cartridge Holder and dispose the Cartridges (CA).
Dispose the fluid in the Discharge Tray also.

8-4 Extraction Protocol with QG-Mini80

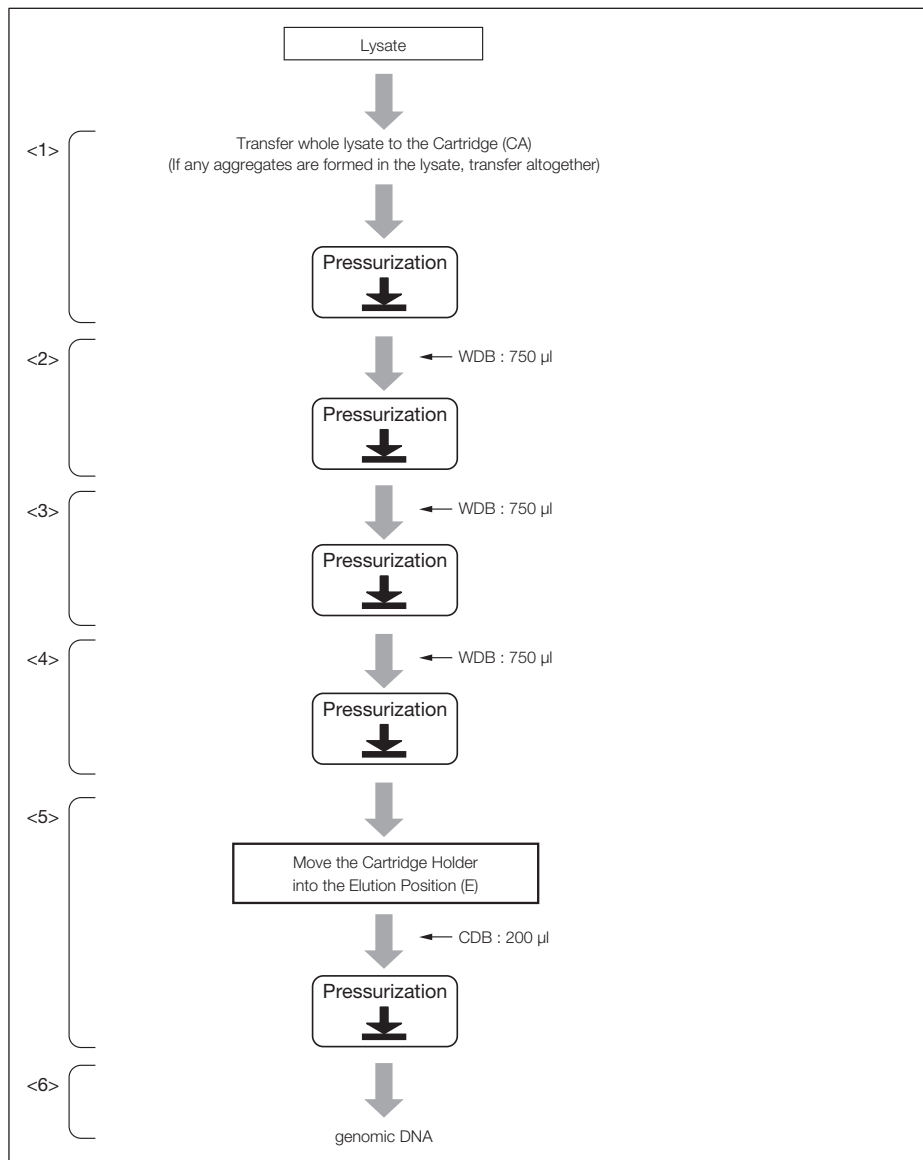
- Please read the User's Guide of QG-Mini80 for the details before using the system.
- Check that 160 ml of >99% ethanol is added to WDB before starting an experiment.
- Set Waste Tubes (WT) into the Tube Holder.
- Set Tube Adapters to the Tube Holder, and set Collection Tubes (CT). In substitution for Collection Tubes, you can use 1.5 ml microtubes. In this case Tube Adapters are unnecessary.
- Insert the Cartridge Holder into the Wash Position (W) of the Tube Holder. Then set Cartridges (CA) to the Cartridge Holder. Confirm the Release Lever is positioned at the left-hand end of the Cartridge Holder.

- When setting the Cartridge Holder and the Tube Holder to QG-Mini80, insert to the end.
- When pressuring lysates and WDB (>99% ethanol added), confirm that the Wash Label on the Tray can be entirely seen.
- When pressuring CDB, confirm that the Wash Label on the Tray can not be seen, being hidden below the Tube Holder.

- Avoid touching the filter in the Cartridge (CA) with the pipette tip.
- Any solution and waste fluid containing LDB should not be mixed with bleach.
- When using potentially infectious samples for experiments, dispose of them according to the applicable regulations.

QG-Mini80 Workflow

The pressurization mark “Pressurization” in the workflow indicates the following operations.

1. Set the Cartridge Holder and the Tube Holder in QG-Mini80.
2. Rotate the Rotary Switch toward the front side to apply air pressure to the Cartridges.
3. Make sure that no liquid remains in the Cartridges (CA) and then return the Rotary Switch to the original position.
4. Pull out the Cartridge Holder and the Tube Holder from QG-Mini80.

Details of QG-Mini80 Workflow

<1> <Applying lysate> Carefully transfer the whole lysate prepared at 8-2 (p.11) to each Cartridge (CA). Set the Cartridge Holder and the Tube Holder into QG-Mini80. After setting it, check the Wash Label can be seen. Rotate the Rotary Switch toward the front side to apply air pressure to the Cartridges.
Make sure that no lysate remains in the Cartridges and then return the Rotary Switch to the original position.

If any aggregates are formed in the lysate, transfer altogether with the aggregates to the Cartridge.
Perform the extraction operation quickly after completion of lysis. It is possible to leave it until 30 min if necessary.
Pressure application automatically stops in about 1 min. If any lysate remains in the Cartridges even after about 1 min has elapsed, return the Rotary Switch to the original position and then rotate it toward the front side to put pressurized air into the Cartridges again.

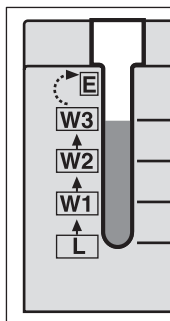
<2> <First wash> Pull out the Cartridge Holder and the Tube Holder and then apply 750 µl of WDB to the Cartridges (CA). Set the Cartridge Holder and the Tube Holder into QG-Mini80. After setting it, check the Wash Label can be seen. Rotate the Rotary Switch toward the front side to apply air pressure to the Cartridges.
Make sure that no WDB remains in the Cartridges and then return the Rotary Switch to the original position.

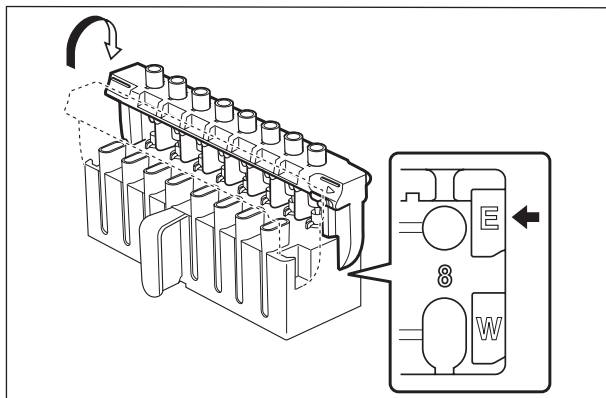
Pressure application automatically stops in about 1 min. If any WDB remains in the Cartridges even after about 1 min has elapsed, return the Rotary Switch to the original position and then rotate it toward the front side to put pressurized air into the Cartridges again.

<3> <Second wash> Pull out the Cartridge Holder and the Tube Holder and then apply 750 µl of WDB to the Cartridges (CA). Set the Cartridge Holder and the Tube Holder into QG-Mini80. After setting it, check the Wash Label can be seen. Rotate the Rotary Switch toward the front side to apply air pressure to the Cartridges.
Make sure that no WDB remains in the Cartridges and then return the Rotary Switch to the original position.

Pressure application automatically stops in about 1 min. If any WDB remains in the Cartridges even after about 1 min has elapsed, return the Rotary Switch to the original position and then rotate it toward the front side to put pressurized air into the Cartridges again.

<4> <Third wash> Pull out the Cartridge Holder and the Tube Holder and then apply 750 μl of WDB to the Cartridges (CA). Set the Cartridge Holder and the Tube Holder into QG-Mini80. After setting it, check the Wash Label can be seen. Rotate the Rotary Switch toward the front side to apply air pressure to the Cartridges.
Make sure that no WDB remains in the Cartridges and then return the Rotary Switch to the original position.

Pressure application automatically stops in about 1 min. If any WDB remains in the Cartridges even after about 1 min has elapsed, return the Rotary Switch to the original position and then rotate it toward the front side to put pressurized air into the Cartridges again.
After third wash, the waste fluid scale of the Tube Holder indicates [W3] position. (Refer to the following illustration)
Do not add WDB four or more times. The contamination might be caused the waste fluid touching the Cartridges, or the waste fluid might overflow from the Waste Tubes.

<5> <Elution> Pull out the Cartridge Holder and the Tube Holder and then insert the Cartridge Holder into the Elution Position (E) of the Tube Holder. Do not touch the Release Lever. Apply 200 μl of CDB to the Cartridges (CA) and then set the Cartridge Holder and the Tube Holder in QG-Mini80. After setting it, check the Wash Label cannot be seen by hiding under the Tube Holder. Rotate the Rotary Switch toward the front side to apply air pressure to the Cartridges. Make sure that no CDB remains in the Cartridges and then return the Rotary Switch to the original position.

Pressure application automatically stops in about 1 min. If any CDB remains in the Cartridges even after about 1 min has elapsed, return the Rotary Switch to the original position and then rotate it toward the front side to put pressurized air into the Cartridges again.
The volume of CDB can be reduced to 50 μl, but in the case, elution efficiency might decrease by about 20%.

<6> Pull out the Cartridge Holder and the Tube Holder. Remove the Cartridge Holder from the Tube Holder and then dispose of the Cartridges (CA). When sliding the Release Lever to the right-hand end, all Cartridges will fall down. Remove the Collection Tubes and then insert the Collection Tubes into the Tube Rack (optional) and then put Caps (CAP).
When the Tube Rack is not used, remove the Collection Tubes after putting Caps on them.
When using commercially available 1.5 ml microtubes : Put caps on 1.5 ml microtubes and then remove them.
Dispose the Waste Tubes and waste fluid according to appropriate laws and rules.

The standard yield is 4 to 8 µg from 200 µl of whole blood samples.
Cover with the Caps (CAP) on the Collection Tubes (CT) tightly, store at 4°C or –20°C.
In case of storing genomic DNA for a long time, it is recommended to preserve them at –20°C.

9. Troubleshooting

Review the information below to troubleshoot the experiments with QuickGene DNA whole blood kit S (DB-S).

(*) : For QG-810/QG-800
(**) : For QG-Mini80

(1) Low yield or no DNA obtained :

Cause	Action
Inappropriate storage conditions for whole blood sample	Use a whole blood sample within 3 days after collection as much as possible. The yield of DNA might decrease, or degradation of DNA might be caused when a blood sample preserved for a long time is used.
Inadequate dissolution of EDB	After addition of nuclease-free water to EDB leave it for 30 min or more at room temperature with occasionally stirring it. Use it after confirming the powder is completely dissolved.
Insufficient enzymatic activity of EDB	Reconstituted EDB is stable for 2 months when stored at 4°C. Do not use EDB preserved for a longer period than 2 months. Storage at –20°C will prolong the life of EDB, but repeated freezing and thawing should be avoided. Dividing the solution into aliquots and storage at –20°C is recommended.
Inappropriate addition order of reagents and whole blood sample	When preparing lysates, perform the additions to a 1.5 ml microtube in the following order : EDB (previously dissolved in 3.3 ml of nuclease-free water) → Whole blood sample → LDB.
Inappropriate volume of whole blood sample	If the volume of a whole blood sample is too much, reduce it to the prescribed volume (200 µl). Small amount of sample should be adjusted to 200 µl with PBS (sterilized) before loading.
Use of too much amount of leucocytes	The yield of DNA might decrease when the number of leucocytes exceeds 2×10^6 cells/200 µl. In such cases, adjust the number of leucocytes by diluting the sample with PBS (sterilized) to below 2×10^6 cells/200 µl.
Insufficient homogenization after addition of LDB	Immediately after addition of LDB, pipette (or mix upside-down), and then vortex sufficiently (for 15 sec). Perform vortex at the maximum speed (2,500 rpm or more is recommended).
Inappropriate volume of ethanol in lysate	Add the prescribed volume of >99% ethanol.
Insufficient homogenization after addition of ethanol	After addition of ethanol, vortex sufficiently (for 15 sec). Perform vortex at the maximum speed (2,500 rpm or more is recommended).
No addition of the prescribed volume of ethanol to WDB	Before using WDB for the first time, ensure that the prescribed volume of >99% ethanol has been added. (See section 8-1 p.9)
Incomplete addition of whole lysate to the Cartridge (CA)	If any aggregates are formed in the lysate, transfer altogether with the aggregates to the Cartridge.
Insufficient volume of CDB (**)	Confirm the amount of CDB is 50 µl or more.
Rupture of filter	Be careful not to allow pipette tip to contact with a filter in the Cartridge (CA).
Perform exceed pressurization (**)	Stop applying air pressure as soon as lysate or WDB is discharged.
Leaving Cartridge (CA) after lysate or WDB are discharged (**)	During the procedure, work quickly without interruption.
Use of reagents other than CDB to elute genomic DNA	Use CDB to elute genomic DNA.
Use of too old WDB (*)	Check if WDB (>99% ethanol added) setted in QG-810/QG-800 does not pass over 1 day.

Cause	Action
DNA degradation	Refer to (3) “DNA degradation”.
Inadequate volume of any buffer (*)	Confirm that the set volumes for each buffer to QG-810/QG-800 are adequate.

(2) Clogging of Cartridge (CA) occurs :

Cause	Action
Use of too much amount of a whole blood sample	Reduce it to the prescribed volume (200 μl).
Use of too much amount of leucocytes	The Cartridge (CA) might clog when the number of leucocytes exceeds 5×10^6 cells/200 μl. The yield of DNA might decrease when the number of leukocytes exceeds 2×10^6 cells/200 μl . In such case, we recommend that you dilute the sample with PBS (sterilized) to below 2×10^6 cells/200 μl, and then perform extraction.
Insufficient homogenization after addition of LDB	Immediately after addition of LDB, pipette (or mix upside-down), and then vortex sufficiently (for 15 sec). Perform vortex at the maximum speed (2,500 rpm or more is recommended).
Insufficient homogenization after addition of ethanol	After addition of ethanol, vortex sufficiently (for 15 sec). Perform vortex at the maximum speed (2,500 rpm or more is recommended).

(3) DNA degradation :

Cause	Action
Inappropriate storage conditions for whole blood sample	Use a whole blood sample within 3 days after collection as much as possible. The yield of DNA might decrease, or degradation of DNA might be caused when a blood sample preserved for a long time is used.

(4) Purity of DNA is low :

Cause	Action
Inappropriate storage conditions for whole blood sample	Use a whole blood sample within 3 days after collection as much as possible. The yield of DNA might decrease, or degradation of DNA might be caused when a blood sample preserved for a long time is used.
Insufficient enzymatic activity of EDB	Reconstituted EDB is stable for 2 months when stored at 4°C. Do not use EDB preserved for a longer period than 2 months. Storage at –20°C will prolong the life of EDB, but repeated freezing and thawing should be avoided. Dividing the solution into aliquots and storage at –20°C is recommended.
Inappropriate addition order of reagents and whole blood sample	When preparing lysates, perform the additions to a 1.5 ml microtube in the following order : EDB (previously dissolved in 3.3 ml of nuclease-free water) → Whole blood sample → LDB.
Insufficient homogenization after addition of LDB	Immediately after addition of LDB, pipette (or mix upside-down), and then vortex sufficiently (for 15 sec). Perform vortex at the maximum speed (2,500 rpm or more is recommended).
Inappropriate volume of ethanol in lysate	Add the prescribed volume of >99% ethanol.
Insufficient homogenization after addition of ethanol	After addition of ethanol, vortex sufficiently (for 15 sec). Perform vortex at the maximum speed (2,500 rpm or more is recommended).
No addition of the prescribed volume of ethanol to WDB	Before using WDB for the first time, ensure that the prescribed volume of >99% ethanol has been added. (See section 8-1 p.9)

Cause	Action
Improper washing procedure (**)	Wash 3 times with 750 μl of WDB.
Use of reagents other than CDB to elute genomic DNA	Use CDB to elute genomic DNA.

(5) Subsequent experiments such as PCR etc. do not proceed well :

Cause	Action
Inappropriate amount of DNA is used	Determine the DNA concentration based on the absorbance at 260 nm.
Low purity of DNA	Refer to (4) “Purity of DNA is low”.
DNA degradation	Refer to (3) “DNA degradation”.

(6) A precipitate is formed in reagents :

Cause	Action
Stored at low temperature	Store buffers at room temperature (15-28°C). If a precipitate is formed, dissolve the precipitate by incubation at 37°C. Cool down it to room temperature before use.

(7) No sample is recovered in Collection Tube (CT) or 1.5 ml microtube (it is vacant) :

Cause	Action
Insufficient set of CDB or no operation of discharging (*)	Set the prescribed volume of CDB according to Table 3 (p.10). In addition, it is necessary to perform a discharging operation according to the User’s Guide of QG-810/QG-800.
Not addition of CDB (**)	After insert the Cartridge Holder to the Elution Positon (E), add 200 μl of CDB to Cartridge (CA).
No transfer of the Cartridge Holder to the Elution Position (E) when adding CDB (**)	When adding CDB, addition has to be started after the transfer of the Cartridge Holder to the Elution Position (E).

(8) Cartridge (CA) can not be held on the Cartridge Holder :

Cause	Action
No return of the Release Lever to the left end (**)	Confirm that the Release Lever is positioned at the left-hand end of the Cartridge Holder, and then set Cartridges (CA).

10. Ordering Information

Product	Cat #
QuickGene DNA tissue kit S	DT-S
For extraction of genomic DNA from tissues	
QuickGene DNA whole blood kit S	DB-S
For extraction of genomic DNA from whole blood	
QuickGene RNA tissue kit S II	RT-S2
For extraction of total RNA from tissues	
QuickGene RNA cultured cell kit S	RC-S
For extraction of total RNA from cultured cells	
QuickGene RNA cultured cell HC kit S	RC-S2
For extraction of total RNA from cultured cells	
QuickGene RNA blood cell kit S	RB-S
For extraction of total RNA from leukocytes	
QuickGene Plasmid kit S	PL-S
For extraction of plasmid DNA from *Escherichia coli*	

.

Appendix 1 Setting of QG-810 Parameter

In the case of using QG-810, select "DNA WHOLE BLOOD" mode. The parameter of "DNA WHOLE BLOOD" is the following Table.

Display Sequence	LCD message	PARAMETER
1	BIND PEAK	120
2	WASH COUNT	3
3	WASH PEAK	110
4	WASH VOL1	750
5	WASH VOL2	750
6	WASH VOL3	750
7	WASH VOL4	750
8	WASH VOL5	750
9	WASH DIP TM	0
10	WAS2 WAIT T	0
11	WAS2 COUNT	0
12	WAS2 PEAK	110
13	WASH VOL1	750
14	WASH VOL2	750
15	WASH VOL3	750
16	WASH VOL4	750
17	WASH VOL5	750
18	ELUT VOL	200
19	ELUT PEAK	100
20	ELUT DIP TM	0

* When changing CDB volume to 50 μl, change "ELUT VOL" to "50".
  When changing the parameter, refer to QG-810 User's Guide.

Appendix 2 Setting of QG-800 Parameter

In the case of using QG-800, select “DNA WHOLE BLOOD” mode. The parameter of “DNA WHOLE BLOOD” is the following Table.

Display Sequence	Operation menu	PARAMETER
1	SAMP PEAK	120
2	WASH COUNT	3
3	WASH PEAK	110
4	WASH VOL1	750
5	WASH VOL2	750
6	WASH VOL3	750
7	WASH VOL4	750
8	WASH VOL5	750
9	WAS2 COUNT	0
10	WAS2 PEAK	110
11	WAS2 VOL1	750
12	WAS2 VOL2	750
13	WAS2 VOL3	750
14	WAS2 VOL4	750
15	WAS2 VOL5	750
16	CLCT VOL	200
17	CLCT PEAK	120

* When changing CDB volume to 50 μl, change “CLCT VOL” to “50”.
  When changing the parameter, refer to QG-800 User’s Guide.

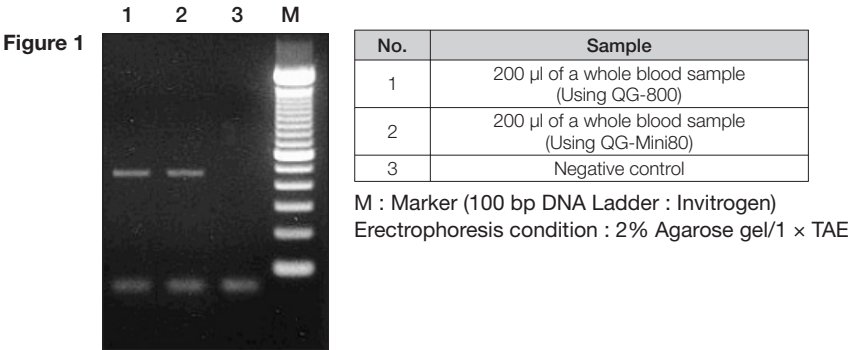
Appendix 3 Examples of the Data with QuickGene DNA whole blood kit S (DB-S)

● **PCR**

Figure 1 shows an example of PCR of genomic DNA extracted with this kit.
PCR was performed with 0.1 ng of genomic DNA extracted from 200 µl of a whole blood sample with this kit using G3PDH as a target.

Figure 1

No.	Sample
1	200 µl of a whole blood sample (Using QG-800)
2	200 µl of a whole blood sample (Using QG-Mini80)
3	Negative control

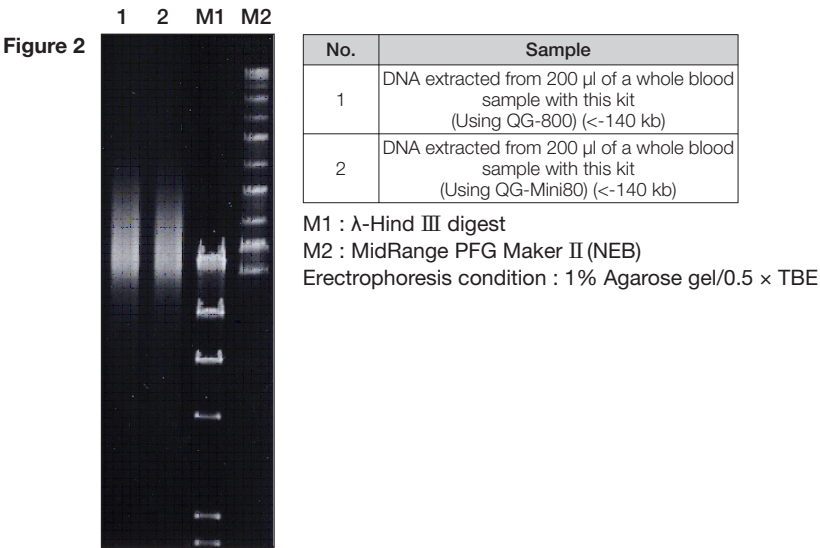
M : Marker (100 bp DNA Ladder : Invitrogen)
Erectrophoresis condition : 2% Agarose gel/1 × TAE

As a result of this PCR, the band of the amplification product from 0.1 ng of genomic DNA template was detected.

● **Results of pulse field electrophoresis**

Figure 2 shows the length of genomic DNA extracted with this kit.

Figure 2

No.	Sample
1	DNA extracted from 200 µl of a whole blood sample with this kit (Using QG-800) (<-140 kb)
2	DNA extracted from 200 µl of a whole blood sample with this kit (Using QG-Mini80) (<-140 kb)

M1 : λ-Hind Ⅲ digest
M2 : MidRange PFG Maker Ⅱ (NEB)
Erectrophoresis condition : 1% Agarose gel/0.5 × TBE

From the result, genomic DNA extracted with this kit has a length of less than 140 kb.